

Copolymer production

Patent Number: ☐ EP0204442, A3, B1
Publication date: 1986-12-10
Inventor(s): SENIOR PETER JAMES; COLLINS STEPHN HUGH; RICHARDSON KENNETH RAYMOND
Applicant(s): ICI PLC (GB)
Requested Patent: ☐ JP61293385
Application Number: EP19860303558 19860509
Priority Number (s): GB19850013310 19850528
IPC Classification: C12P7/62; C08G63/06; C12N1/20; C12N1/20; C12R1/05
EC Classification: C08G63/06, C12P7/62A
Equivalents: AU5782586, AU601681, BR8602397, CA1313635, DE3682328D, IN167933, JP2049265C, JP7079705B, NZ216268, ZA8603661
Cited Documents: EP0069497; EP0114086; EP0124309; EP0144017

Abstract

Copolymers of poly(beta -hydroxybutyric acid) and poly(beta -hydroxyvaleric acid) are produced by culturing alcohol-utilising strains of *Alcaligenes eutrophus* on a carbon source including primary alcohols having an odd number of carbon atoms such as propan-1-ol.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-79705

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)8月30日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 P 7/62

識別記号

庁内整理番号

7432-4B

F I

技術表示箇所

発明の数1(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願昭61-123214

(22) 出願日 昭和61年(1986)5月28日

(65) 公開番号 特開昭61-293385

(43) 公開日 昭和61年(1986)12月24日

(31) 優先権主張番号 8 5 1 3 3 1 0

(32) 優先日 1985年5月28日

(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

微生物の受託番号 NCIB 1 2 0 8 0

(71) 出願人 999999999

ゼネカ・リミテッド

イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ
6エルエヌ, スタンホープ ゲート 15

(72) 発明者 ビーター・ジェームズ・シニア

イギリス国クリーブランド, ミドルスプロ
ウ, イングルビー・グリーンハウ, フォー
リス・コテージ (番地なし)

(72) 発明者 スティーヴン・ヒュー・コリンズ

イギリス国ノース・ヨークシャー州 ノー
スオーラートン, オズマザーリィ, クラッ
ク・バンク, “レイヴンスダウン” (番地
なし)

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外3名)

審査官 谷口 博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヒドロキシ酪酸/ポリバレリン酸共重合体の製法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリゲネス・オイトロフスのPHB蓄積株を、ある基質で、該微生物が少なくとも10重量%のPHB含有重合体を蓄積するような重合体蓄積条件下において培養することからなる、PHB含有重合体の製造方法であって、該アルカリゲネス・オイトロフスのPHB蓄積株もまたアルコールを利用することができ、PHB含有重合体がPHB/PHN共重合体であること、並びに、該微生物が重合体蓄積条件下で培養される時間の少なくとも一部の間、該基質がメタノール以外の奇数個の炭素原子を有する少なくとも1種の第1アルコールからなることを特徴とする上記の製造方法。

【請求項2】 第1アルコールがプロパン-1-オールである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項3】 第1アルコールが共重合体蓄積期間中に存

2

在する基質の全炭素含量のうちの少なくとも10重量%の炭素含量を与える、特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

【請求項4】 第1アルコールが共重合体蓄積期間中に存在する基質の全炭素含量のうちの少なくとも25重量%の炭素含量を与える、特許請求の範囲第3項に記載の方法。

【請求項5】 アルコール利用アルカリゲネス・オイトロフス株が、アルカリゲネス・オイトロフスNCIB12080である、特許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 第1の段階において少なくとも5g/lの非共重合体細胞物質の濃度を支持するのに足る資化性窒素源を含む水性培地中の資化性炭素源で、アルコール利用アルカリゲネス・オイトロフス菌株を培養し、そして次の

第2段階において窒素飢餓条件下で培養を継続することからなる特許請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、共重合体の製造方法、さらに詳しくはβ-ヒドロキシ酪酸とβ-ヒドロキシバレリアン酸類との共重合体の製造方法に関する。この明細書において、ポリβ-ヒドロキシ酪酸を「PHB」と称し、またポリβ-ヒドロキシバレリアン酸を「PHV」と称する。従つて、本発明はPHB/PHV共重合体の製造に関する。

PHBは、式-CH(CH₃)CH₂COO-なる繰返し単位を含み、多くの微生物によつてエネルギー備蓄物質として蓄積される熱可塑性ポリエステルである。そのような微生物は、殊にバクテリア、例えばアルカリゲネス(Alcaligenes)属、アチオルロジウム(Athiorhodium)属、アゾトバクテル(Azotobacter)属、バシルス(Bacillus)属、ノカルジア(Nocardia)属、シユウドモナス(Pseudomonas)属、リゾビウム(Rhizobium)属、及びスピリリウム(Spirillum)属のバクテリアである。

ポリβ-ヒドロキシ酪酸は、水性培地中で微生物を、炭水化物またはメタノールのようなエネルギー及び炭素源としての基質で培養することにより都合よく調製できる。その基質は、もちろん、その微生物によつて資化されるものでなければならない。そのような重合体の蓄積を促進するには、培養のうちの少なくとも一部分は、微生物の成長にとつて必須であるけれども重合体蓄積にとつては要求されない栄養素の制限が行なわれる条件下で実施されるのが好ましい。適当な方法は欧州特許第15669号及び第46344号ならびに米国特許第4336334号及び第4433053号明細書に記載されている。

米国特許第4477654号明細書には、PHB/PHV共重合体は、アルカリゲネス・オイトロフス(A. eutrophus)のようなある種の微生物を培養する際に、その培養のうちの重合体蓄積段階の少なくとも一部分中に基質の少なくとも一部分として、ある種の有機酸(例えばプロピオン酸)またはその誘導体(例えば塩またはエステル)を用いることにより製造しうることが記載されている。

PHB/PHV共重合体類は、多くの工業分野において種々の用途を有している〔例えば「ケミカル・ウィーク(Chemical Week)」1985年8月28日号第55頁、及び「マニユファクチュアリング・ケミスト(Manufacturing Chemist)」1985年10月号第64頁の論文参照〕。

アルカリゲネス・オイトロフスは、エタノールのようなアルコール類を通常は利用しない〔1981年スプリングル・フエルラグ(Springer Verlag)発行、M.P.スター(Starr)等編集の「ザ・プロカリオートズ(The Prokaryotes)」の第882頁第70章参照〕。

しかし突然変異及び/または選択操作によつて、エタノール利用性の変異株または突然変異株を得ることが可能である。

我々は、そのようなエタノール利用変異株がその他の第1アルコール類、例えばプロパン-1-オールを資化することもでき、そして重合体蓄積を促す条件下でメタノール以外の奇数個の炭素原子を有する第1アルコールを含む基質で培養されるときには、PHB/PHV共重合体を蓄積することを、発見した。

従つて、本発明は、ポリβ-ヒドロキシ酪酸を蓄積しうるアルカリゲネス・オイトロフス菌株をある基質で、該微生物が少なくとも10重量%の共重合体を蓄積する如き条件下に培養することからなるPHB/PHV共重合体の製法であつて、該微生物がその共重合体蓄積条件下で培養される時間の少なくとも一部分の間、該基質がメタノール以外の奇数個の炭素原子を有する第1アルコールからなることを特徴とする上記製法を、提供する。

本発明に使用しうるアルカリゲネス・オイトロフスのアルコール利用菌株は、NCIB12080株〔このものはアーデインのナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・バクテリア(NCIB)に1985年5月2日に寄託された〕である。後者の株は、エタノールを利用しないグルコース利用株、例えばNCIB11599(1980年8月18日にNCIBに寄託)を、基質としてグルコースを用いて酸素制限下に連続培養方式で培養し、次いでグルコース及びエタノールの混合物を含む基質での炭素制限に移行させる(ただしその際には基質中のグルコースに対するエタノールの割合を次第に増大させて、基質が全部エタノールになるようにする)ことにより、得ることができる。一般に、アルカリゲネス・オイトロフスのエタノール利用株は、エタノールデヒドロゲナーゼ酵素を誘発することにより得られる。これは酸素供給の制限により都合よく実施できる。一旦その酵素が誘発された後、連続培養においてエタノールに曝すと、エタノール利用株を選択できる。酸素入手利用性を次第に増加させて、この選択を促進することができる。

アルカリゲネス・オイトロフスを、適当な基質(すなわちエネルギー及び炭素源)で好気培養すると増殖のための必須要素の一つまたはそれ以上が用い尽されるまで、増殖が起こる。このような微生物の増殖を以下「成長」と称する。成長必須要素の用尽のときには、それ以上の成長は、たとえあつたとしても、非常に制限された度合で生じるだけであるが、基質が用尽されていないならば、β-ヒドロキシブチレート重合体はその微生物によつて蓄積される。

若干の微生物については、一つまたはそれ以上の成長必須要素の制限の如き重合体誘発制約が存在しない場合でさえも、微生物の成長が起こっている際に重合体も蓄積されることがある。しかしながら、重合体を本質的に産生する微生物の場合を除き、そのようにして蓄積される重合体の量は少ないのが普通であり、典型的には産生細胞の約10重量%より少ない。それでも完全用尽の直前に約30重量%に達する重合体蓄積が起こることがありう

る。従つて、重合体を本質的に産生しない微生物は、回分式培養で成長される場合に、一つまたはそれ以上の成長必須要素がほとんどまたは完全に用い尽され、次いで微生物が重合体を合成するに至るまでは、重合体を全くまたはほとんど蓄積せずに成長することになる。共重合体を産生させるためには、共重合体が蓄積される期間中に存在する基質の少なくとも一部分として奇数個の炭素原子を含むアルコールを使用する必要がある。

培養条件が、共重合体は何らかの有意な程度にまで蓄積されないような条件であるとき、すなわち培養条件が、蓄積共重合体の量が微生物細胞乾燥重量の10重量%に満たないような条件である場合には、奇数個炭素原子アルコールは共重合体を生じさせない別の経路によつて微生物により代謝されることが多く、従つてそのような場合には共重合体は産生されないのが普通である。そのような別の経路による代謝は、共重合体を本質的に蓄積する微生物を使用する場合にも起こりうる。

従つて本発明では、本質的な重合体蓄積性微生物を使用する場合であつても、成長のためには必須であるが重合体の蓄積には必須ではない要素の一つまたはそれ以上のものの量が制限された条件下で微生物を培養することにより、共重合体を蓄積させるのが好ましい。微生物を、成長のための必須要素の制限があり、従つて共重合体が微生物によつて蓄積される条件下で培養する場合でさえも、奇数個炭素を有するアルコールのいくつかはTCAサイクルのアセチルCoAまたは中間体類に向かう経路によつて代謝されることがある。これによつて、たとえ奇数個の炭素原子を含むアルコールが重合体蓄積段階中の唯一の基質であつたとしても、微生物が、共重合体中へ導入されるためのβ-ヒドロキシブチレート単位ならびにβ-ヒドロキシバレレート単位を合成することができるようになる。

共重合体を産生させるには、共重合体が蓄積されつつある期間の少なくとも一部分中に、基質は奇数個の炭素原子を含む第1アルコール（メタノール以外）を含む。かかるアルコールは、好ましくは、ヘプタン-1-オール、ペンタン-1-オール、または殊にプロパン-1-オールである。それらのアルコールの混合物を用いることもできる。奇数個の炭素原子を有するアルコールまたはアルコール混合物は、微生物により資化されうる別の基質（例えばエタノール、あるいはグルコースの如き炭水化物）と混合して使用されうる。

共重合体中に可成りの割合のヒドロキシバレレート単を生じさせるには、奇数個の炭素原子を有するアルコールまたはアルコール混合物の形の基質中の化合炭素の量が、共重合体が微生物によつて蓄積されるような培養条件の期間中に存在する基質中の合計化合炭素の少なくとも2重量%、好ましくは少なくとも10重量%であるのが好ましい。奇数個の炭素原子を有するアルコールまたはアルコール混合物は、重合体蓄積段階中に用いられる基

質の少なくとも25重量%をなす。

上述のように、本質的に共重合体を産生する微生物を用いる場合でさえも、成長にとつて必要とされる共重合体蓄積に必要とされない栄養素の制限の条件下で共重合体を蓄積させる培養期間を設けるのが好ましい。

基質及び酸素（このものは普通、培養器内の水性培地中へ空気を射出することにより供給される）に加えて、微生物の成長のためには種々の栄養塩類が必要とされる。

従つて、資化可能な形（通常は水溶性塩）の下記の塩類源が普通必要とされる。すなわち、窒素、燐、硫黄、カリ、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、及び鉄、ならびに微量元素（マンガン、亜鉛及び銅等）である。培養器への酸素の供給を制限することにより共重合体蓄積を誘発することも可能であるが、一つまたはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのが最も実用的である元素は、窒素、燐、酸素あるいは、余り好ましくはないがマグネシウム、硫黄またはカリである。これらのもののうちで、窒素（このものはアンモニウム塩の形で都合よく供給される）の量を制限するのが最も好ましい。必要とされる資化可能窒素の量は、細胞（共重合体低蓄積）の所望重量の約8~15重量%である。

培養は、共重合体含有細胞の乾燥重量が水性培地1ℓ当たり少なくとも5gとなるように実施するのが好ましい。従つて、例えば40重量%の共重合体含量を有する重合体含有細胞を1ℓ当たり5g産生させようとするならば、細胞成長量を制限するのに用いられる培養器へ供給される必須栄養の量は、共重合体を含まない細胞6g/lの成長を支持するのに必要とされる量とすべきであり、従つて窒素を成長制限栄養として使用するならば、共重合体を含まない菌体細胞の窒素含量は約8~15重量%であるから、必要とされる資化可能窒素の量は、約0.5~0.9g/lであり、例えばアンモニウムイオン約0.6~1.2g/lである。

培養は、アルカリゲネス・オイトロフス種微生物について慣用の条件、例えばpH、温度及び曝気度（酸素が制限栄養として用いられない限り）で実施しうる。同様に、栄養塩の使用量（上記概略した考慮に従つて量が決定される成長制限栄養以外のもの）は、上記微生物の成長のために通常用いられる量であつてよい。

微生物は、炭水化物のような容易に代謝しうる基質を用いて、共重合蓄積段階では制限されるべき成長必須栄養を十分に存在させて培養することによりある所望重量にまで成長させ；次いで成長必須栄養の制限条件下で培養して共重合体の蓄積を生じさせるのが、好ましい。若干の場合には、成長段階の少なくとも一部分（ある場合には全部）のための基質は、奇数個の炭素原子を有するアルコールであつてよい。

培養は回分式培養の形で実施してよく、その場合には、共重合体蓄積は、成長のためには必要であるが共重合体蓄積のためには必要でない栄養の量が枯渇されるに至る

につれて生じることになる。別法として培養は連続法の形で実施してもよく、その場合には菌体細胞を含む水性培地は、培養槽に新鮮な水性培地及び基質を添加する急速（流量）に相当する速度（流量）で培養槽から、連続的または断続的に除去される。培養槽へ供給される栄養（制限されるもの）の量は、培養槽から除去される水性培地が該栄養（制限されるもの）を全くまたはほとんど含まないような量であり、次いで培養から除かれたその水性培地を第2の培養槽に供給するのが好ましい。第2培養槽は回分式または（好ましくは）連続式で運転され、これに共単量体成分からなる追加量の基質を添加して好気培養を継続することにより共重合体の蓄積を生じさせる。この第2の培養工程で追加量の基質及び栄養塩類を添加してもよいが、さらに成長することは一般的には望まれないから、成長を制限するのに用いられる栄養はほとんどまたは全く添加されるべきでない。しかし、第1の培養槽から第2の培養槽（単または複数）に供給される水性培地は若干の残留量の制限栄養を含みうることを、及び／または少量の制限栄養をさらに添加することは効率的操作のために望ましいことがあることは了解されよう。

別法として、培養は単一段階連続法の形で実施されてもよい。栄養制限により共重合体蓄積を達成するためには、培養槽における培地の滞留時間は、微生物が成長し、そして培養槽へ供給される制限栄養を用い尽し、次いで微生物が共重合体を蓄積するのに充分であるように、長い時間にされる。

上記の回分式または連続式の方法のいずれにおいても、奇数個の炭素原子を有するアルコールは、成長のために必要とされる栄養が用い尽されたときに起こる共重合体蓄積段階の間の基質の一部分または全体として用いられる。

培養は蓄積共重合体の量が菌体細胞の約30~80重量%をなすように実施するのが好ましい。

共重合体は、普通50,000以上の分子量（重量平均）及びD（-）型であり、これは種々の方法、例えば欧州特許第15123号明細書に記載された方法、により微生物細胞から抽出される。

本発明を以下の実施例により説明する。

微生物アルカリゲネス・オイトロフスNCIB12080変異株の説明

形態

CMHO 75%寒天上で成長、30°Cで5時間。

グラム陰性、概略寸法0.8μ×6μの運動状棒状。

細胞内顆粒明らかな。

孢子形成せず。

相コントラスト顕微鏡下で場合により半極毛が観察された。

コロニーの形態（Lab 8栄養寒天）—丸形、規則的、不透明、平滑、白色、凸状コロニー。

3日後に直径が約2mmであつた。

古くなると淡褐色着色発現。

温度

5°Cで成長せず。

37°Cで成長。

45°Cで成長。

グラム染色（30°C）

カタラーゼ +

コバクス オキシダーゼ +

10 O・F グルコース 極弱酸化性

ピオシアニン —

螢光 —

L-アルギニンCSU —

ベタイン CSU —

グルコース CSU —

乳酸塩 CSU +

酢酸塩 CSU +

CSUアラビノース —

メソ・イノシトール —

20 キシロース —

ガス・グルコース —

ONPG —

アルギニン（Moller） —

リシン（Moller） —

オルニシン（Moller） —

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ —

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ + (37°C)

DNA ase —

ゲル（せんし） —

30 ゲル（平板） —

カゼイン —

でんぶん —

レシチン（卵） —

リバーゼ（卵） —

NH_3 弱陽性

インドール —

H_2S —

ツ ウイーン80 +

ウレアーゼ +

40 メタノールで5または14日で成長を示さず。プロパン-1-オールで3日で成長を示す。ペニシリンG及びストレプトマイシンに対し抗性；クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ポリミキシンB及びノボビオシン（弱く）に感受性。

実施例1

アルカリゲネス・ナイトロフス変異株NCIB12080を、51の培養槽中で、約41の実効容積として0.1/時間の希釈速度（滞留時間の逆数）で、pH6.8及び34°Cにおいて連続好気培養により成長させた。使用水性培地は下記の組成

50 を有した（脱イオン水1ℓ当り）。

燐 (H_3PO_4 として)	630	mq
マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ として)	80	mq
カリウム (K_2SO_4 として)	200	mq
ナトリウム (Na_2SO_4 として)	16	mq
マンガン ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$ として)	1.25	mq
亜鉛 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ として)	1.15	mq
銅 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ として)	0.25	mq
カルシウム ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ として)	36	mq

窒素を水酸化アンモニウムとして11.5g/l含む水溶液及び硫酸第一鉄2g/lを含む水溶液を、それぞれ硫酸で酸性化したものの形で鉄及び窒素も連続的に供給した。それらの供給量は、培養槽に入る培地中の窒素及び鉄含量がそれぞれ1040mg/l及び7mg/lとなるようにした。

エタノール及びプロパン-1-オールは、それぞれ12.1g/l及び12.6g/lとなるように供給した。

pHは、4Mの水酸化カリウム及び4Mの水酸化ナトリウム水溶液の9:1混合物の自動添加により6.8に制御した。

5日間の定常状態培養の後に、培養槽からの流出培地の細胞乾燥重量は16.14g/lであり、その細胞は47重量%のPHB/PHV共重合体を含み、その共重合体は約20モル%のPHV単位を含み、そして133°Cの融点(DSC法で測定)を有していた。

実施例2

下記の変更を行なつて実施例1を繰り返した。

稀釈速度	0.105/時
窒素含量	976mg/l
プロパノール供給量	21.4g/l
エタノール供給量	0

5日間の定常状態培養の後に、細胞乾燥重量は12.02g/lであり、その細胞は38重量%の重合体生成物を含んでいた。その重合体生成物は実施例1の重合体よりも全体として、高いPHV含量を有したが、複雑な生成物であつて、三つの明確な融点ピークを92.4°C、110°C及び171°Cのところに示した。これは、おそらく、その重合体がβ*

*-ヒドロキシブチレートホモ重合体と一つまたはそれ以上のPHB/PHV共重合体とのブレンドであることを示すと考えられる。

実施例3

アルカリゲネス・オイロトフスNCIB12080を5lの培養槽中pH6.8及び34°Cにおいて好気培養条件下に供給回分方式で成長させた。

NCIB12080培養物(80ml)を下記組成(mg/脱イオン水1l)の水性培地(3.4l)に接種した。

燐 (H_3PO_4 として)	100
カリウム (K_2SO_4 として)	250
マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ として)	250
ナトリウム (Na_2SO_4 として)	25
硫酸アンモニウム [$(NH_4)_2SO_4$]	2000

微量元素溶液:

カルシウム	35
マンガン	1.25
亜鉛	1.15
銅	0.25
鉄	3
エタノール	1800

pHは50% (v/v) 水酸化アンモニウム溶液の自動添加により6.8に制御した。

10.5時間後に培養液は炭素制限状態となつた。そしてエタノール(335g/l)及びプロパン-1-オール(52g/l)のブレミックス供給物を培養槽に導入した。全体で620mlの混合供給物を33時間にわたり培養槽へ添加し、平均でエタノールが2g/l時の添加速度となるようにした。

最終の乾燥細胞重量は33g/lであり、細胞はPHB/PHV共重合体を71%含み、その共重合体は約10モル%のヒドロキシブチレート単位を含んでいた。この共重合体はDSC法(指差熱分析法)で測定して158°Cの融点を有した。

フロントページの続き

(72)発明者 ケネス・レイモンド・リチャードソン
イギリス国クリーブランド、ノーマンビー、アシュカーク・ロード 18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)